

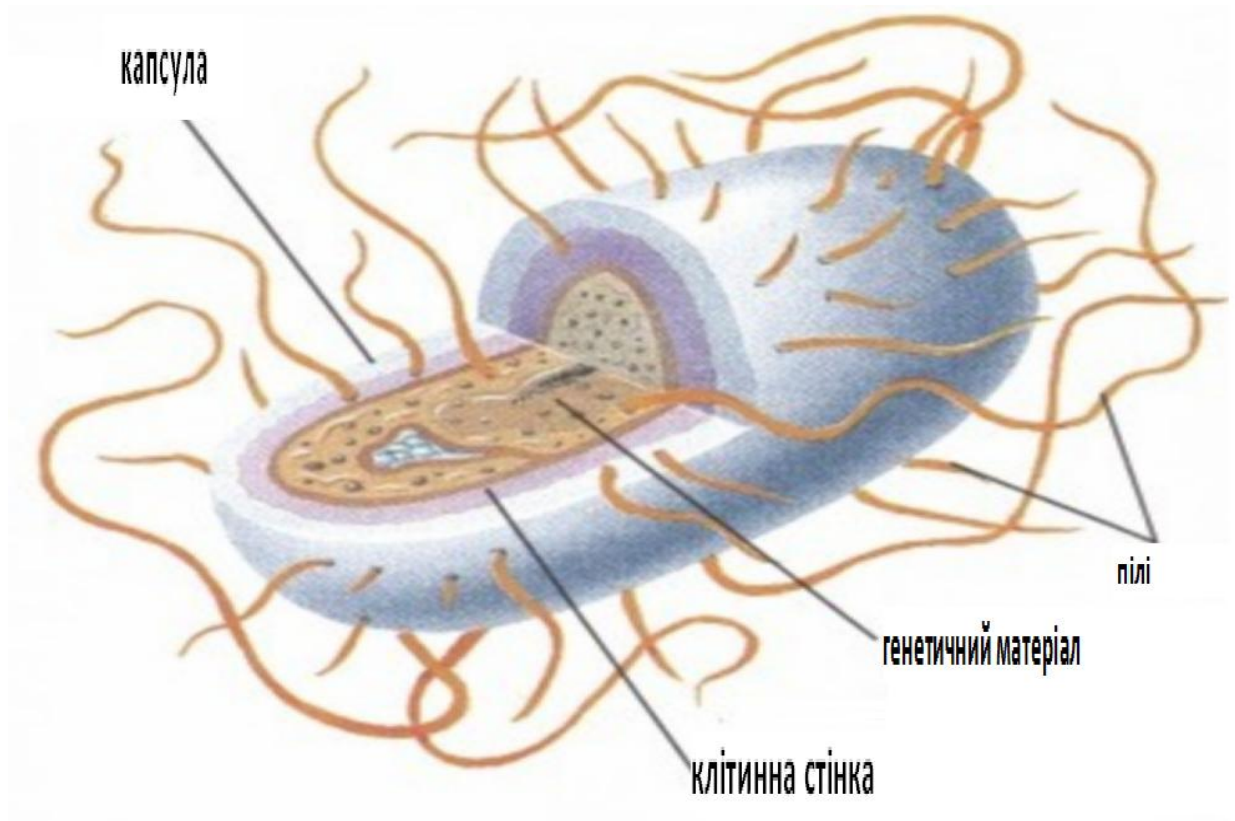
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
Кафедра мікробіології та вірусології

ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ

методичні вказівки для забезпечення самостійної роботи студентів



Біла Церква

2022

УДК 619:576.8(07)

Затверджено вченою радою
екологічного (Протокол № 1 від 08.2022)

Укладачі: канд. **Рубленко І.О.** – доктор вет. наук, доцент, **Зоценко В.М.** – к.
вет. наук, доцент;

Тарануха С.І., Островський Д.М. – магістри, асистенти; **Чемеровська І.О.**
– асистент

Загальна мікробіологія: Методичні вказівки для самостійної роботи студентів екологічного факультету, зі спеціальності 207 Водні біоресурси та аквакультура / Рубленко І.О., Зоценко В.М., Тарануха С.І., Островський Д.М., Чемеровська І.О. – Біла Церква – 2022 – 20 с.

Методичні вказівки складені відповідно до програми з загальної мікробіології. Кількість, перелік та порядок виконання робіт на практичних заняттях визначені робочим планом вивчення курсу водної мікробіології. Кожна робота розпочинається коротким теоретичним обґрунтуванням матеріалу для вивчення, що полегшує самостійну підготовку студентів до виконання практичних завдань.

Рецензенти: **Н. Гриневич**, доктор вет. наук, професор, БНАУ

В. Скрипник, доктор вет. наук, генеральний директор громадської спілки Українська асоціація виробників і дистриб'юторів ветеринарних препаратів та кормових добавок.

ЗАНЯТТЯ 1

Тема: Мікробіологічний практикум, правила роботи в ньому та техніка безпеки. Мікроскопічне дослідження бактерій і робота з імерсійною системою мікроскопа. Морфологія бактерій

Студентський мікробіологічний практикум. Для проведення лабораторно-практичних занять з мікробіології на кафедрах мікробіології у вищих навчальних закладах повинні бути обладнані учбові практикуми, де студенти опановують методи мікробіологічних досліджень та проводять науково-дослідну роботу. Для них відводять просторі світлі кімнати з гладенькими стінами і підлогою, непроникними для вологи та придатними до застосування миючих засобів та дезінфектантів. Тому підлогу необхідно вкривати лінолеумом або гладенькою плиткою, а стіни – світлою масляною фарбою або облицювати висотою на 1,5 м світлим кахелем. У практикумі повинні бути холодна та гаряча вода, раковина з каналізацією, обов'язково педальне відро для сміття, дезінфікуючий розчин, мило, рушник.

Правила роботи і техніка безпеки у студентських мікробіологічних практикумах. Працюючі у студентських мікробіологічних практикумах та лабораторіях, обов'язково повинні дотримуватися певних санітарних правил, спрямованих на запобігання розповсюдженню збудників у зовнішньому середовищі та зараження працюючих викладачів і студентів. Тому всі співробітники кафедри мікробіології, аспіранти та студенти, які займаються в них, перед роботою та навчанням зобов'язані ознайомитися з правилами роботи і техніки безпеки, розписавшись у спеціальному журналі. Потрібно бездоганно дотримуватися наступних правил:

- заходити у приміщення практикумів та лабораторні кімнати і працювати в них дозволяється тільки у спецодязі (халат, шапочки або косинки);
- забороняється приносити з собою сторонні речі, продукти. Сумки та пакети складають у спеціально відведеному місці;
 - забороняється пити, їсти і палити;
 - за кожним студентом закріплюється робоче місце, мікроскоп та інші прилади;

- забороняється запалювати один пальник від іншого;
- не дозволяється вмикати електрообладнання в мережу без дозволу викладача;
- склянки з досліджуваним матеріалом обробляють дезрозчином і ставлять у кювети;
- кожний матеріал, що використовується на заняттях, розглядати як особливо небезпечний;
- при дослідженні матеріалу і роботі з культурами мікроорганізмів слід дотримуватись загальноприйнятих у мікробіології правил, які виключають можливість зараження працюючого;
- якщо інфікований матеріал потрапить на стіл, терміново приймають заходи по його знезараженню;
- після закінчення роботи інфікований матеріал, культури мікроорганізмів, інструменти і поверхню стола знезаражують;
- наприкінці заняття культури мікроорганізмів і патологічний матеріал студенти здають викладачу, на робочих місцях наводять порядок;
- забороняється виносити з лабораторії пробірки з культурами, виготовлені препарати тощо;
- після закінчення роботи студенти знімають спецодяг, миють руки, а у разі необхідності, обробляють їх дезрозчином.

Мікроскопія. Світлова мікроскопія. Мікроскопічне дослідження дозволяє виявляти морфологічні особливості мікроорганізмів, їх тінкторіальні властивості (реакція на барвники), наявність спеціальних структур (спор, капсул, включень) та рухливість. У нашій країні найбільш розповсюджені світлові мікроскопи. Окрім світлової, в мікробіології використовують також люмінесцентну мікроскопію, мікроскопію у темному полі та фазово-контрастну з використанням спеціальних пристроїв до світлового мікроскопу, або спеціальних мікроскопів. Вони можуть збільшувати досліджувані об'єкти до 2000 разів. Існують також електронні мікроскопи, які збільшують досліджуваний об'єкт у 50 000 разів і більше.

Будова мікроскопа. У світловому мікроскопі розрізняють дві частини – механічну й оптичну. До *механічної частини* належить штатив, який складається з основи і колонки, предметний столик з отвором посередині, клемми-затискачами та двома центруючими гвинтами, тубус, обертальний револьвер з отворами для об'єктивів та макро- і мікрогвинти для переміщення тубуса (рис.1). Макрогвинтом проводять грубу наводку, а мікрогвинтом, повний оберт якого складає 0,1 мм, більш точну різкість. У

деяких мікроскопів предметний столик буває рухомим у двох перпендикулярних напрямках горизонтальної площини за допомогою двох гвинтів, або нерухомий, а у інших може навіть обертатися навколо вертикальної осі. *Оптична частина* включає освітлювальний апарат, окуляр та об'єктив.

Техніка проведення мікроскопії. Темнопольна мікроскопія використовується для вивчення рухливості мікроорганізмів та діагностики бактерій. Для вивчення рухливості мікроорганізму досліджують препарат "роздавлена крапля", виготовлений з молодої бульйонної культури в такій послідовності:

- препарат кладуть на предметний столик мікроскопа і фокусують з об'єктивом 8 х;
- замість звичайного конденсора встановлюють конденсор темного поля;
- повністю відкривають діафрагму, ставлять матовий світлофільтр, максимально включають реостат освітлення і за допомогою дзеркала встановлюють рівномірне освітлення поля зору;
- трохи опускають конденсор і на верхню лінзу наносять краплю імерсійної олії або дистильованої води;
- обережно піднімають конденсор доки імерсійна рідина не пошириться по нижній поверхні предметного скла;
- на малому збільшенні фокусують мікроскоп на препараті.

Після появи у полі зору світлої плями, інколи з темним центром, за допомогою гвинтів переміщення предметного столика переводять її до центру, а інтенсивність зображення регулюють підняттям або опусканням конденсора. Після цього встановлюють об'єктив бажаного збільшення – найчастіше 40 х і фокусують.

Електронна мікроскопія. В електронному мікроскопі замість пучка світла використовується потік електронів, а скляні лінзи замінено на електромагнітні поля. Довжина хвилі електронних променів у багато разів менша за довжину хвиль світлових, внаслідок чого роздільна здатність електронних мікроскопів значно вища і становить близько 0,3–0,5 нм (3–5А), що дозволяє одержати значне збільшення і спостерігати об'єкти, невидимі у світловому мікроскопі.

М о р ф о л о г і я бактерій. Бактерії – це живі, головним чином, одноклітинні істоти рослинного походження, які не мають хлорофілу і розмножуються простим поперечним діленням. За формою вони поділяються на три групи: *кулясті /коки/, паличкоподібні та звивисті.* Серед *кулястих* розрізняють: *монококи* – розміщені поодинокі, *мікрококи* – малі, *диплококи* – по

два мікроорганізми, *тетракоки* – по чотири, *сарцини* – пакети з 8–16 та більше, *штококи* – у вигляді ланцюгів та *стафілококи* – скупчення мікроорганізмів у вигляді виноградного грона. *Паличкоподібні* форми поділяють на: *власне бактерії* – палички, *бацили* – палички зі спорами та *кlostридії* – палички зі спорами, діаметр яких перевищує діаметр мікроорганізму. Вони розміщуються поодиноці, парами, ланцюгами, під кутом або скупченнями. Кінці паличок можуть бути заокругленими, прямокутними, загостреними чи потовщеними. Спори можуть розміщуватися в центрі клітини (центрально), ближче до кінця (субтермінально) або на кінці (термінально). Деякі бактерії набувають розгалуженої форми, інші мають вигляд переплетених ниток. *Звивисті* форми бактерій поділяють на три групи: *вібріони*, які мають форму коми, *спірили* – мають 2–4 великих завитки та *спірохети* – мають більше 5 завитків, штопороподібної форми.

Контрольні питання.

1. З чого складається механічна та оптична системи світлового мікроскопа ?
2. Сухі та імерсійні об'єктиви та правила користування імерсійною мікроскопією.
3. Як визначити загальне збільшення світлового мікроскопа ?
4. Які ще види мікроскопів використовуються для дослідження мікроорганізмів?
5. Охарактеризуйте три основні форми бактерій.
6. Які існують різновиди коків?
7. Що таке бактерії, кlostридії і бацили ?
8. Охарактеризуйте представників звивистих бактерій.

ЗАНЯТТЯ 2

Тема 1. Виготовлення препаратів-відбитків з патологічного матеріалу та препаратів-мазків з культур мікроорганізмів.

Головні барвники і прості методи фарбування

Мета заняття. Навчити студентів виготовляти препарати-мазки з культур мікроорганізмів та препарати-відбитки з патологічного матеріалу. Ознайомити студентів з головними аніліновими барвниками, виготовленням їх розчинів та простими методами фарбування.

Тема 2: Складні методи фарбування

Мета заняття. Навчити студентів техніці фарбування мікроорганізмів за Грамом, Ціль-Нільсеном та спеціальними методами фарбування спор і капсул.

Оснащення заняття: знежирені предметні скельця, бактеріологічні петлі, спиртівки або газові пальники, пінцети, смужки фільтрувального паперу, зливні чашки з містком, олівці для скла, розчини фарб (карболовий генціанвіолет, водний розчин фуксину та розчин метиленової синьки), 96 % спирт-ректифікат, 5 % розчин карболової кислоти, розчин Люголю; пробірки

із суспензією суміші з однодобових культур золотистого стафілокока та кишкової палички. Мікроскопи, імерсійна олія, серветки та таблиці зі спорота капсулоутворюючими мікроорганізмами, забарвленими за Грамом.

Методика виконання завдання. Для мікроскопічного дослідження виготовляють препарати на предметному склі, дотримуючись правил асептики. З культур мікроорганізмів, вирощених на щільних та рідких живильних середовищах, молоці, крові та гною з допомогою бактеріальної петлі готують препарати-мазки, а з уражених тканин та органів (печінка, селезінка, лімфатичні вузли тощо) – препарати-відбитки. Бактеріологічна петля на кінці має заокруглення діаметром у 1,5–3 мм і виготовляється з матеріалу, що швидко розжарюється (червоніє) і швидко вистигає.

Головні барвники. Для фарбування бактеріальних клітин використовують частіше основні та нейтральні анілінові фарби: фіолетові (генціанвіолет, кристалвіолет, метилвіолет), червоні (основний фуксин, сафранін), зелені (малахітовий або брильянтовий зелений) та сині (метиленовий синій). З деяких фарб спочатку готують насичені спиртові розчини, з яких потім отримують робочі розчини, з інших – водні розчини. Найбільш часто використовують карболовий розчин генціанвіолету, карболовий розчин фуксину (фуксин Ціля) та його робочий розчин (фуксину Пфейффера), лужний розчин метиленового синього (за Леффлером), водні розчини – 2 % сафраніну, 1 % малахітової зелені та фарбу Романовського-Гімзи.

Прості методи фарбування. У простих методах використовують одну фарбу внаслідок чого бактерії забарвлюються в один колір. Вони дозволяють виявити форму мікроорганізму, інколи – зернистість; іноді може спостерігатись явище метахромазії (розщеплення кольору). Для цього фіксований мазок кладуть на "місток" над зливною чашкою і наносять розчин однієї фарби: карболовий генціанвіолет (обов'язково через смужку фільтрувального паперу), робочий розчин фуксину, або розчин сафраніну на 1-2 хв, а лужний розчин метиленової синьки – на 3–5 хв. Потім фарбу зливають, промивають водою, висушують і оглядають під імерсійною системою.

Контрольні питання

1. Правила приготування препаратів-мазків із культур мікроорганізмів, вирощених у рідкому та твердому поживному середовищі.
2. Виготовлення препаратів-відбитків з патологічного матеріалу.

3. Які існують методи фіксації мазків і що вона дає?
4. Які фарби застосовуються у мікробіології для забарвлення препаратів ?
5. Що дозволяє виявляти забарвлення мікроорганізмів?
6. Якими фарбами і з якою експозицією користуються при простих методах фарбування?

Тема: Складні методи фарбування

Техніка фарбування за Грамом. На фіксований полум'ям мазок, вкритий смужкою фільтрувального паперу, наливають на 2–3 хв розчин карболового генціанвіолету. Потім папір знімають, залишки барвника зливають і наливають на мазок розчин Люголя на 1–2 хв, після чого його зливають і наносять на 30–40 с 96° етиловий спирт. Препарат ретельно промивають водою і додатково фарбують водним розчином карболового фуксину (1–2 хв). Потім препарат промивають водою, висушують і мікроскопують під імерсійною системою. Грампозитивні (Гр+) бактерії забарвлюються у фіолетовий колір, а грамнегативні забарвлюються у рожево-червоний.

Неоднакове забарвлення бактерій пояснюється різною будовою та хімічним складом клітинної стінки.

У грампозитивних клітинна стінка товста, містить багато (до 80 %) пептидоглікану, мікрофібрили якого утворюють густу сітку, що міцно утримує комплекс із генціанвіолету, і він не видаляється під дією спирту. У грамнегативних бактерій клітинна стінка значно тонша, містить мало пептидоглікану (від 1 до 10 %), мікрофібрили останнього утворюють більші "пори", які не втримують генціанвіолет, і він видаляється під дією спирту. Тому після дофарбування розчином фуксину вони сприймають рожево-червоний колір.

Метод Ребігера. На нефіксований мазок наносять на 2 хв. розчин генціанвіолету у формаліні (15–20 г фарби у 100 мл 40 % формаліну). Тіла мікробних клітин фарбуються у фіолетовий колір, а капсули – у рожевий. Цей метод можна використовувати у польових умовах.

Контрольні запитання.

1. Техніка фарбування за Грамом.
2. Фарбування кислотостійких бактерій.
3. Чому одні бактерії фарбуються за Грамом позитивно, а інші — негативно ?
4. Методи фарбування спор.

5. На чому базуються методи фарбування капсул та техніка їх виконання?

ЗАНЯТТЯ 3

Тема 1: Дослідження бактерій у живому стані. Вивчення рухливості бактерій

Мета. Навчити студентів вивченню рухливості бактерій шляхом дослідження препаратів "роздавлена крапля" та "висяча крапля", методом Шукевича та культивуванням у напівтвердому середовищі. Ознайомити з рухом мікроорганізмів у світловому мікроскопі, з конденсором темного поля та фазово-контрастним.

Методика виконання завдання. У природі існують рухомі та не рухомі мікроорганізми, тому вивчення рухливості бактерій проводять як з метою ідентифікації так і диференціації схожих індивідуумів. Органами руху у бактерій є джгутики, які мають вигляд спірально зігнутих ниткоподібних утворень і, завдяки гвинтоподібним обертам, зумовлюють хаотичний рух уперед, хоча здатні і до таксису. Вони є похідними цитоплазматичної мембрани, відходять від її базального тільця і складаються з субодиниць білку флагеліну, який є повноцінним антигеном, що відрізняється від соматичного. Побудовані із спіральної нитки, гачка і базального тільця і мають вигляд тонких (діаметр 12–18 нм) та довгих циліндрів, які інколи можуть значно перевищувати довжину мікроорганізму – від 10 до 20 мкм, а в деяких випадках навіть до 80–90 мкм. Тому їх не видно у звичайному світловому мікроскопі і для фарбування використовують методи імпрегнації, спрямовані на нашаровування фарб або реактивів з метою штучного збільшення діаметру.

Кількість джгутиків та їх розташування характерні для окремих видів мікроорганізмів. Залежно від цього, бактерії поділяють на: *монотрихи*, що мають один полярний джгутик, *амфітрихи* – джгутики є на обох кінцях клітини, по одному чи по кілька; *лофотрихи* – пучок джгутиків розташований на одному кінці клітини; *перетрихи* – джгутики знаходяться на всій поверхні клітини.

Для визначення руху мікробів використовують молоді 18–24 годинні бульйонні культури або конденсати з агарових культур; та змив у фізіологічному розчині з поверхні добових культур на МПА.

Контрольні запитання

1. Чим зумовлена рухливість бактерій?
2. Як поділяються бактерії залежно від кількості та розміщення джгутиків?

3. Якими методами вивчають рухливість мікроорганізмів?
4. Охарактеризуйте рух лептоспір.

Тема 2: Морфологія грибів та актиноміцетів

Мета. Ознайомити студентів з морфологічними особливостями мікроскопічних грибів, дріжджоподібних організмів та актиноміцетів.

Методика виконання завдання. Морфологія грибів.

Гриби, що можуть розмножуватися поряд з іншими способами і статевим, називаються досконалими, а ті які не мають статевого розмноження – недосконалими.

Типовим представником нижчих грибів (фікоміцетів) є мукові гриби, зокрема мукор або головчаста цвіль, її міцелій несептований, плодонесучі органи – спорангієносці з плодовими тілами – спорангіями на кінцях, усередині яких знаходяться спорангіоспори. Після дозрівання спорангії розриваються і спори розповсюджуються у зовнішньому середовищі. Розмножуються усіма способами, на агарі Чапека мукор утворює пухкий сірий наліт. Серед вищих грибів найбільше розповсюдження і значення мають недосконалі гриби, особливо гіфоміцети родів пеніциліум, аспергілюс, фузаріум, трихофітон та ін.

У **пеніциліїв** (китичкова цвіль) міцелій та конідієносці септовані (рис. 7), розгалужені, на верхівці утворюють китички з ланцюгами одноклітинних конідій. На агарі Чапека ростуть у вигляді ніжного пухкого нальоту сіро – зеленого або яскраво-зеленого кольору з білою смужкою по периферії. Ці гриби значно поширені у природі, викликають псування кормів, деякі продукують антибіотики (пеніцилін), а інші виробляють токсичні речовини.

Серед них є патогенні види, що викликають фузаріози риб, рослин, а також токсигенні види, що продукують різні фузаріотоксини, які викликають отруєння людей і тварин, інші виробляють стимулятори росту тварин і рослин (ралгро, гібереліни).

У деяких вищих грибів (**дріжджі та дріжджоподібні організми**) міцелій відсутній, а їхнє вегетативне тіло представлене окремими клітинами овальної форми розміром близько 10 мкм.

Контрольні запитання

1. Чим відрізняються гриби від бактерій ?
2. Як поділяються гриби ?

3. Морфологічні особливості мукових грибів, пеніциллів, аспергиллів, фузарій?
4. Чим відрізняються від істинних грибів дріжджі та дріжджоподібні мікроорганізми?
5. Чим відрізняються актиноміцети від грибів та бактерій?
6. Особливості культивування та дослідження грибів та актиноміцетів

Тема 3: Основні методи стерилізації

Мета. Ознайомити студентів з основними методами стерилізації, їх призначенням і практичним використанням, а також з існуючою апаратурою.

Оснащення заняття: стерилізатори (електричний, простий), ножиці, скальпелі, апарат Коха, водяна баня, сушильна шафа (піч Пастера), автоклав, бактерицидні ультрафіолетові лампи, азбестові фільтри Зейтца, мембранні, керамічні (Шамберлена, Беркефельда), насос Комовського, вата, папір, піпетки пастерівські та градуйовані, бактеріологічні чашки з МПА, культури сапрофітів в МПБ, колби, ватяно-марлеві пробки, бікси, скальпелі, ножиці, бактеріологічні петлі.

Стерилізація (знепліднювання, неплідність) – це знищення усіх живих істот у будь-якому матеріалі. Використовують різні фізичні і хімічні методи, при яких дотримуються двох основних вимог: досягнення повного знепліднення та збереження фізико-хімічних властивостей у стерилізуючому матеріалі. До фізичних методів відносять: фламбування, стерилізацію гарячим повітрям, кип'ятіння, парою, ультрафіолетовими променями, ультразвуком, бактеріальними фільтрами. В їх основі лежить згубна дія на мікроорганізми високої температури, УФ променів, ультразвуку та здатність бактеріальних фільтрів затримувати бактерії.

Пастеризація – це метод часткового знезараження продуктів (молоко від хворих тварин, різні консерви, вино), який запропонував Л.Пастер. Для цього продукти нагрівають одноразово до 65–90 °С, з наступним їх охолодженням до 4 °С. На практиці використовують кілька варіантів пастеризації: тривалу – продукти нагрівають при 65 °С 30 хв, короткочасну – при 72–78 °С 15–20 с. та миттєву – проводять при 85–90 °С 1–2 с. При цьому відбувається загибель тільки вегетативних форм бактерій, а спорові форми не розвиваються за низької температури, тому її не можна вважати методом стерилізації.

Контрольні запитання

1. Що таке стерилізація та її призначення?
2. Які існують фізичні методи стерилізації та їх характеристика?
3. Принципи будови та роботи сушильної шафи, апарата Коха.
4. Будова автоклава та його використання.

5. Бактеріологічні фільтри та принципи їх використання.
6. Хімічна та біологічна стерилізація і їх застосування.
7. Пастерізація, її режими та використання.

ЗАНЯТТЯ 4

Тема 1. Живильні середовища для культивування мікроорганізмів.

Мета заняття. Вивчити призначення та виготовлення живильних середовищ і ознайомити з апаратурою для культивування мікроорганізмів.

Мікроорганізми культивують у лабораторних умовах на спеціально виготовлених *живильних середовищах*. За походженням їх поділяють на *природні* (молоко, картопля, морква, горох, пивне сушло тощо) та *штучні*, виготовлені за певними рецептами. Вони бувають рослинного і тваринного походження, за *консистенцією* – рідкі, тверді та напіврідкі, а за *призначенням* – звичайні (основні) або *універсальні*: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), на яких ростуть різні види мікроорганізмів, та *спеціальні*. Останні поділяються на елективні, на яких ростуть тільки окремі види, диференційно-діагностичні – для диференціації бактерій за протеолітичними, цукролітичними, гемолітичними та іншими властивостями та збагачувальні (середовища нагромадження). До диференційних відносяться середовища нового покоління – хроматогенні. Їх використовують для виявлення високоспецифічних ферментів у досліджуваного мікроорганізму. До складу середовища входять хромогенний субстрат, що дозволяє виявляти візуально забарвлення різного кольору колоніє утворювальних одиниць. Більшість хроматогенних середовищ містять селективні добавки, які затримують ріст сторонньої мікрофлори .

Живильні середовища повинні відповідати таким вимогам: бути стерильними, ізотонічними, мати достатню кількість речовин-джерел азоту та вуглецю, вуглеводів та вітамінів, мати оптимальний рН. Рідкі середовища повинні бути прозорими (окрім молока), а тверді – мати достатню вологість.

рН живильних середовищ має велике значення для росту і розвитку мікроорганізмів. Тому її оптимізують шляхом додавання 10–20 % розчинів лугів. Визначають рН у лабораторіях колориметричним методом, з допомогою спеціального приладу (рН-метр) та смужками індикаторного паперу.

Сухі живильні середовища. Сучасна біологічна промисловість випускає багато середовищ в готовому вигляді, або в сухому. Їх використання в лабораторній практиці значно полегшує роботу з виділення та ідентифікації мікроорганізмів. Зокрема широко використовується поживний бульйон на основі гідролізату ківки, поживний агар на основі ферментативного гідролізату кормових дріжджів та багато інших різноманітних середовищ. Їх приготування завжди детально наведено на упаковках кожного живильного середовища.

Контрольні запитання

1. Як поділяються живильні середовища за походженням, консистенцією та призначенням? 2. Яким основним вимогам повинні відповідати живильні середовища?

3. Як виготовляють звичайні поживні середовища? Як готують середовища для культивування анаеробних мікроорганізмів та грибів?

4. Виготовлення середовищ для вивчення протеолітичних та цукролітичних властивостей. Живильні середовища для культивування грибів.

Тема 2. Техніка посіву та культивування мікроорганізмів в аеробних і анаеробних умовах

Мета заняття. Освоїти техніку посіву і пересіву мікробів на тверді і рідкі живильні середовища та культивування мікроорганізмів в аеробних та анаеробних умовах.

У мікробіології відпрацьована техніка проведення цих маніпуляцій, яка спрямована на проведення посівів і пересівів без забруднення їх сторонніми мікроорганізмами й одночасно запобігає розповсюдженню їх у зовнішньому середовищі. Ці маніпуляції проводять у стерильних стаціонарних або настільних боксах біля факела. Інструменти для проведення посіву використовують стерильні: бактеріологічні петлі обпалюють, ножиці, скальпелі, шпателі, шприци кип'ятять, а пастерівські піпетки обгортають папером і стерилізують автоклавуванням.

Первинний посів матеріалу для виділення аеробних мікроорганізмів проводять найчастіше на звичайні поживні середовища (тверді і рідкі) – МПБ і МПА. Якщо ж деякі мікроорганізми не ростуть на них, то використовують спеціальні живильні середовища. Для стимуляції росту мікроорганізмів на живильних середовищах посіви культивують при постійній температурі у термостатах і враховують тип дихання їх. Мікроорганізми, що виростають на

поживних середовищах, називають мікробними або бактеріальними культурами.

Для культивування анаеробів створюють умови анаеробіозу фізичними, хімічними та біологічними методами. Фізичний метод полягає у видаленні повітря з ексикатора чи анаеростата.

Анаеростат – це металевий циліндр з герметичною кришкою, кранами для видалення повітря та вакуум-манометром. Повітря видаляють з допомогою вакуумного насоса. Промисловість випускає також термоанаеростат, що представляє анаеростат з пристосуванням у нижній частині для електропідігріву та терморегулятор для підтримки постійної температури.

Після посіву на пробірках і чашках пишуть номери експертиз, або назви органів чи інвентарні номери культур, дату посіву і для покращення росту мікроорганізмів їх ставлять у термостат з оптимальною температурою. Пробірки у більшості випадків ставляють у штативах, чашки розміщують на полицях кришкою донизу.

Контрольні запитання

1. Що таке культивування мікроорганізмів і які потрібні для цього пристосування?
2. Як проводиться посів та пересів на тверді поживні середовища?
3. Принцип будови і роботи термостата та анаеростата?
4. Культивування анаеробних мікроорганізмів та методи створення анаеробіозу?

Тема 3: Методи виділення чистих культур мікроорганізмів

Мета заняття. Ознайомити студентів з методами і технікою виділення чистих культур мікроорганізмів, пересіяти чисті культури бактерій на МПБ та МПА і провести мікроскопічне дослідження забарвлених препаратів- мазків, виготовлених з них.

Метод розведення запропонований свого часу ще Пастером, який згодом був удосконалений. Досліджуваний матеріал поступово розводять у 7–10 пробірках зі стерильним МПБ (по 10 см³). Для цього у першу пробірку вносять 0,1 см³ матеріалу, перемішують, 0,1 см³ суміші переносять у другу пробірку і після перемішування такий же об'єм переносять з другої у третю, іноді до 10 пробірок, одержуючи розведення 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶ і т.д. Пастер вважав, що із збільшенням ступеню розведення досліджуваного матеріалу концентрація

мікроорганізмів зменшується і в останній пробірці можливий ріст одного виду мікроорганізмів. Проте, це маловірогідно, тому для отримання чистої культури по 1 см³ виготовлених розведень останніх пробірок висівають на тверде живильне середовище у бактеріологічні чашки (рис. 14). Після термостатування окремі колонії відсівають на косяки агару, з яких мікроорганізми ростуть у вигляді чистої культури.

Біологічний метод застосовують для отримання *чистих культур патогенних мікроорганізмів*. Лабораторних тварин заражують патологічним матеріалом або мішаною культурою. При наявності патогенних мікроорганізмів сприйнятливі тварини гинуть. З їхніх внутрішніх органів і крові шляхом посіву вдається одержати чисту культуру збудника захворювання.

Застосування селективних поживних середовищ передбачає використання спеціальних середовищ, на яких ростуть тільки певні види мікроорганізмів. Наприклад, нітріфікатори ростуть тільки на мінеральних середовищах, гриби і дріжджі – на агарі Чапека та сусло-агарі. У деяких випадках до поживних середовищ для пригнічення росту одних бактерій додають антибіотики або фарби, які не діють на інших

Виділення чистої культури анаеробів. Для цього застосовують ті ж методи, що і для виділення чистої культури аеробів, але із використанням спеціальних живильних середовищ. Для отримання чистої культури за методом Дригальського посів проводять на глюкозо-кров'яний агар Цейслера і культивують в анаеробних умовах. З цією метою використовують середовище Вільсона-Блера, на якому анаеробні мікроорганізми утворюють колонії чорного кольору, які пересівають на середовище Кітта-Тароцці. Використовують також біологічний метод, для чого сприйнятливих лабораторних тварин заражають суспензією досліджуваного матеріалу або мішаною культурою. Після загибелі тварин їх розтинають і посіви проводять у середовище Кітта-Тароцці, напіврідкий агар високим стовпчиком або на агар Цейслера. Для отримання чистої культури спороутворюючих анаеробів із суміші мікроорганізмів перед посівом її прогрівають у водяній бані при 80 °С 20–30 хв.

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте виділення чистої культури методом розведень Пастера, Коха, Дригальського та Шукевича. Методи виділення

спороутворюючих та патогенних мікроорганізмів, а також застосування елективних поживних середовищ.

2. Методи виділення чистих культур анаеробів .

ЗАНЯТТЯ 5

Тема 1: Культуральні властивості мікроорганізмів

Мета заняття. Ознайомити студентів з методикою вивчення і описування основних ознак росту мікроорганізмів у рідких, напіврідких і щільних живильних середовищах.

Методика виконання завдання. Культуральні властивості мікроорганізмів – це характер росту мікробів на твердих, рідких і напіврідких середовищах. Вони використовуються поряд з іншими показниками при визначенні родової або видової належності мікроорганізмів. Для кожного мікроорганізму характерні певні ознаки росту на поживних середовищах, які в них з часом можуть змінюватися. Тому прийнято характеризувати їх в більшості у 16–18 годинних культурах, за виключенням деяких (збудники бруцельозу та туберкульозу) з повільним ростом впродовж 1–2 міс. Ознаками росту мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі є утворення каламуті , поверхневої плівки, пристінного кільця та осаду. Помутніння може бути інтенсивним, помірним, слабким або у вигляді опалесценції, а деякі види (лептоспіри) взагалі не викликають його. Після осідання каламуті утворюється осад, який може бути багатий, незначний, щільний, пухкий, зернистий, у вигляді шматочка вати, пластівцевий, крихкий, слизовий, сіруватого, білого жовтого або зеленуватого кольору. Певне діагностичне значення має поведження осаду при струшуванні пробірки: він може утворювати рівномірне помутніння, великі та дрібні пластівці , підніматися вгору у вигляді "муарових хвиль", "косичок", "шматочка вати", з помутнінням середовища або без нього. Деякі мікроорганізми можуть утворювати поверхневу плівку, яка буває тоненькою, сітчастою, грубою, складчастою, пухнастою, крихкою, слизовою та різного кольору, а інші ростуть на поверхні у вигляді пристінного кільця.

На щільних середовищах мікроорганізми ростуть утворюючи колонії або у вигляді суцільного нашарування. Колонії бувають поверхневими, придонними та в товщі агару. Колонії мікробів на МПА (у чашках чи пробірках) спочатку розглядають неозброєним оком, а потім із допомогою лупи. Звертають увагу на :

- характер росту: пишний, помірний, бідний;

- форму колоній : округла, овальна, коренеподібна, зіркоподібна;
- розмір колоній: великі – діаметр перевищує 4 мм; середні – діаметр 2–4 мм; дрібні – діаметр 1–2 мм та мізерні (росинки – діаметр менше 1 мм);
- краї: рівні, зубчасті, кучероподібні, хвилясті, бахромчасті;
- поверхню: гладенька, зморшкувата, складчаста, горбиста, матова, борошниста, борозниста;
- рельєф (профіль): плоский, опуклий, кратероподібний, конусоподібний;
- прозорість: прозора, непрозора, каламутна, блискуча, флуоресціююча;
- колір: сірувато-білий, блакитний, золотистий, червоний, оранжевий, зелений, синій або безбарвний;
- консистенція: тверда, крихка, слизувата, тістоподібна, масляниста;
- структура: однорідна, волокниста, плівчаста, зерниста.

Колонії з рівними краями та гладенькою поверхнею відносять до S-форм, з нерівними краями та шорсткою поверхнею – до R-форм, а слизові – до M-форм.

Наявність протеолітичних ферментів у деяких мікроорганізмів призводить до розрідження желатини з різною інтенсивністю і формою, що залежить від виду мікроба (суцільне, пошарове, у вигляді лійки, кратера та панчохи). Аероби ростуть у верхній частині середовища, анаероби – у нижній, а факультативні анаероби – уздовж всього середовища. Враховують також газоутворення.

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте ріст бактерій у рідких живильних середовищах.
2. Висвітліть характер росту мікроорганізмів на твердих живильних середовищах.
3. Наведіть характеристику основних типів колоній, що утворюють бактерії на щільних живильних середовищах.
4. Характеристика росту мікробів у напіврідких середовищах та МПЖ.

Тема 2: Біохімічні властивості мікроорганізмів

Мета заняття. Ознайомити студентів з методами вивчення біохімічних властивостей мікроорганізмів і на прикладі стафілококів, кишкової палички та сальмонел показати значення цих властивостей при ідентифікації даних мікробів.

Методика виконання завдання. Життєдіяльність мікроорганізмів пов'язана з наявністю в них ферментів, які беруть участь у різних біохімічних реакціях, забезпечуючи процеси живлення, дихання, росту і розмноження. У певних умовах кожний вид мікробів виробляє постійні групи ферментів, що розкладають білки і вуглеводи з утворенням кінцевих та побічних продуктів, а деякі окислюють або відновлюють різні субстрати. Тому вивчення біохімічних властивостей дозволяє проводити найбільш точну диференціацію мікроорганізмів.

Контрольні запитання

1. Що таке цукролітичні властивості і як їх визначають ?
2. Що таке протеолітичні властивості та їх визначення ?
3. Визначення індолу, сірководню та аміаку.

4. Як визначають редукуючі та гемолітичні властивості ?
5. Визначення гемолітичних властивостей та типи гемолізу.

Тема 3. Визначення виду мікроорганізмів

Мета заняття. Набуття студентами навичок користування визначниками.

Обладнання та матеріали: визначники Ціона, Бергі; задачі визначення видів мікроорганізмів; таблиці.

Роботу з визначником Бергі починають із ознайомлення з розділом "Техніка ідентифікації", потім за розділом "Ключ до 19 частин визначника" визначають номер частини, до якої належить мікроб, вивчають її ключі й таблиці і вирішують, які ще властивості мікроорганізму необхідно вивчити, щоб скористатися схемою ідентифікації .

Контрольні запитання

1. З яких частин складається визначник Ціона ?
2. Порядок роботи з визначником Ціона.
3. Порядок роботи з визначником Бергі.

ЗАНЯТТЯ 6

Тема : Санітарно-бактеріологічне дослідження води

Мета заняття. Ознайомити студентів з правилами відбору проб води для лабораторного дослідження та оволодіння методами визначення мікрофлори води.

Відбір проб води. Проби води об'ємом близько 500 см³ для аналізу відбирають, дотримуючись правил асептики з допомогою спеціального приладу – батометру. Із відкритих водоймищ її відбирають на відстані 10–15 см³ від поверхні та дна. Водопровідну воду спочатку зливають на протязі 10–15 хв, а потім кран обпалюють. Воду з колодязів відбирають до початку забору її або через 10–12 год. після закінчення користування нею. Дослідження води проводять не пізніше 2 год. після взяття, але при температурі 1–5 °С можна зберігати її упродовж 6 год.

Контрольні питання.

1. Правила відбору проб води.
2. Визначення мікробного числа води.
3. Визначення колітитру та колі-індексу води.

ЗМІСТ

1	Заняття 1. Тема: Мікробіологічний практикум, правила роботи в ньому та техніка безпеки. Робота з імерсійною системою світлового мікроскопу. Морфологія бактерій.	3
2	Заняття 2. Тема: Виготовлення препаратів-мазків із культур мікроорганізмів та препаратів-відбитків із досліджуваного матеріалу. Головні барвники та прості методи фарбування. Тема 2: Складні методи фарбування.	6
3	Заняття 3. Тема 1: Вивчення бактерій у живому стані. Рухливість мікроорганізмів. Тема 2: Морфологія грибів та актиноміцетів. Тема 3: Методи стерилізації.	9
4	Заняття 4. Тема 1: Живильні середовища для культивування мікроорганізмів. Тема 2: Техніка посіву та культивування мікроорганізмів в аеробних та анаеробних умовах. Тема 3: Методи виділення чистої культури мікроорганізмів.	12
5	Заняття 5. Тема 1: Культуральні властивості мікроорганізмів. Тема 2: Ферментативні властивості мікроорганізмів. Тема 3: Визначення виду мікроорганізмів.	16
6	Заняття 6. Тема: Санітарно-бактеріологічне дослідження води.	18

Навчальне видання

ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ

методичні вказівки для забезпечення для самостійної роботи
студентів екологічного факультету

Рубленко І.О., Зоценко В.М., Тарануха С.І., Островський Д.М.,
Чемеровська І.О.